

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

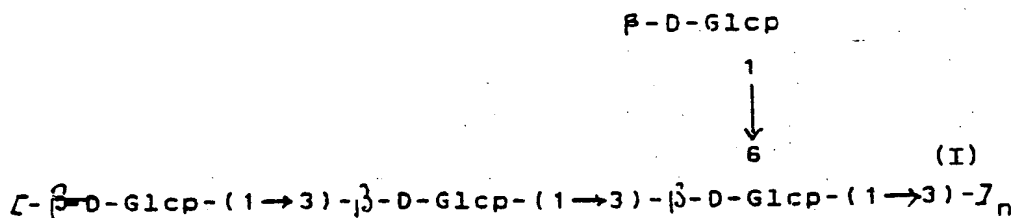
DC

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁴ : C12P 19/04, C08B 37/00 A61K 31/715	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 89/12106 (43) Date de publication internationale: 14 décembre 1989 (14.12.89)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR89/00262 (22) Date de dépôt international: 30 mai 1989 (30.05.89) (30) Données relatives à la priorité: 88/07171 30 mai 1988 (30.05.88) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : LAIGE, Jean-Paul [FR/FR]; 15, rue de la Fraternité, F-92130 Issy-les-Moulineaux (FR). BOUCIAS, Drion [US/US]; 4225 SW 21st Street, Gainesville, FL 32601 (US). FRANZ, Gerhard [DE/DE]; Altdorfer Str. 1a, D-8400 Regensburg (DE). FOURNET, Bernard [FR/FR]; 21, rue du Moulin-d'Asq, F-59560 Villeneuve-d'Asq (FR).		(74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>

(54) Title: FUNGAL EXOPOLYSACCHARIDES HAVING AN IMMUNOSTIMULATING ACTIVITY, PRODUCTION METHOD AND THERAPEUTICAL COMPOSITION CONTAINING THEM

(54) Titre: EXOPOLYSACCHARIDES FONGIQUES AYANT UNE ACTIVITE IMMUNOSTIMULANTE, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET COMPOSITION THERAPEUTIQUE LES CONTENANT

**(57) Abstract**

Fungal exopolysaccharides having an immunostimulating activity comprising glucane-type chains having formula (I), which have between them bridges, and optionally chains of the mannane type, and having a molecular mass at least equal to 5.10^5 .

(57) Abrégé

L'invention a pour objet des exopolysaccharides fongiques ayant une activité immunostimulante, comprenant des chaînes de type glucane de formule (I), qui présentent entre elles des pontages, et éventuellement des chaînes de type mannane et ayant une masse moléculaire au moins égale à 5.10^5 .

Best Available Copy

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	ML	Mali
AU	Australie	FR	France	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Fasso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IT	Italie	RO	Roumanie
BJ	Bénin	JP	Japon	SD	Soudan
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

1

Exopolysaccharides fongiques ayant une activité immunostimulante, leur procédé d'obtention et composition thérapeutique les contenant.

La présente invention concerne des exopolysaccharides fongique ayant une activité immunostimulante chez les vertébrés qui peut être utilisée notamment dans le traitement des tumeurs.

5 On connaît déjà des glucanes ayant une activité immunostimulante qui sont utilisés dans le traitement de cancers. Parmi ces glucanes on peut citer le schizophyllane qui est produit par Schizophyllum commune (T. Matsuo et al, Drug Res. 32, 647, 1982). Ce
10 produit est décrit comme étant un bêta 1,6: bêta 1,3 glucane ayant une masse moléculaire de $4,5 \cdot 10^5$. Il a déjà été utilisé dans le traitement de différents types de cancer.

15 On a maintenant trouvé des exopolysaccharides qui présentent une activité supérieure à celle du Schizophyllane.

La présente invention a ainsi pour objet des exopolysaccharides fongiques ayant une activité immunostimulante, comprenant des chaînes de type glucane
20 de formule

$$\beta\text{-D-Glcp}$$

$$\begin{array}{c} 1 \\ \downarrow \\ 6 \end{array}$$

25 $[\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)}-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)}-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)}-]_n$

qui présentent entre elles des pontages, et éventuellement des chaînes de type mannane et ayant une masse moléculaire au moins égale à $5 \cdot 10^5$.

30 Les exopolysaccharides selon l'invention peuvent être notamment produits par des souches de Nomuraea rileyi qui est un champignon imparfait, pathogène de nombreux lepidoptères défoliateurs, et notamment par des souches déposées ATCC 46372 et ATCC
35 52631.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Toutefois plus généralement ils peuvent être produits par des champignons pathogènes d'invertébrés capables d'excréter un polysaccharide stimulant les réactions de défense d'un invertébré.

5 La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention d'un exopolysaccharide selon l'invention qui consiste à cultiver une souche productrice de l'exopolysaccharide, à séparer par filtration le milieu de culture et à séparer par précipitation ou
10 ultrafiltration les exopolysaccharides du milieu de culture.

Le milieu de culture utilisé avec Nomuraea
rilevi peut être constitué de glucose (3 à 6% en poids) et d'extrait de levure (1 à 2% en poids). Mais
15 on peut également utiliser d'autres sources de carbone telles que des sirops de maïs et d'autres sources d'azote telles que des hydrolysats de protéine du type peptone.

La séparation par précipitation peut être
20 réalisée notamment par de l'éthanol.

En outre il est possible d'obtenir un exopolysaccharide ne comprenant pas de chaînes de type mannane par traitement du produit obtenu par de l'éthanol aqueux à 40%. Ceci peut être réalisé directement en ajoutant au filtrat de culture de l'éthanol
25 de façon à avoir une concentration finale en éthanol voisine de 40%, auquel cas seul l'exopolysaccharide comprenant des chaînes de type glucane précipite.

La présente invention a en outre pour objet
30 une composition thérapeutique comprenant les exopolysaccharides à titre de principe actif.

Les compositions thérapeutiques selon l'invention peuvent être administrées à l'homme ou aux animaux par voie topique ou parentérale, et notamment
35 par voie intramusculaire.

Elles peuvent être sous la forme de préparations solides, semi-solides ou liquides. Comme exemples, on peut citer les solutions ou suspensions injectables, les pommades, les collyres huileux ou aqueux, les collutoires, les solutions nasales et otologiques, ainsi que les formes retard.

Dans ces compositions le principe actif est généralement mélangé avec un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables habituels bien connus de l'homme de l'art.

Les compositions thérapeutiques administrables par voie topique peuvent contenir notamment de 0,1 à 5% en poids du principe actif.

Les compositions thérapeutiques administrables par voie orale ou parentérale peuvent contenir notamment de 1% à 60% en poids de principe actif.

La quantité de principe actif administré dépend évidemment du patient qui est traité, de la voie d'administration et de la sévérité de la maladie.

On décrira ci-après plus en détail l'obtention des exopolysaccharides selon l'invention, leurs caractéristiques et leurs propriétés.

1) Culture de Nomuraea rileyi et séparation des exopolysaccharides.

On cultive une souche de Nomuraea rileyi (ATCC 46372) dans un milieu de culture comprenant 3% de glucose et 1% d'extrait de levure dans des conditions de fermentation submergée. A cet effet, on opère dans un fermenteur en culture discontinue dans les conditions suivantes : 600 tpm, 0,1-1,0 vvm (volume d'air/volume de milieu/minute), 25°C.

Après 48 h de croissance, le milieu de culture et le mycélium sont séparés par filtration. Le filtrat de culture est précipité par éthanol (3-4 vo-

lumes d'éthanol/1 vol. filtrat). Après plusieurs lavages à l'alcool, le précipité est conservé à -20°C en présence d'alcool.

2) Composition et caractéristiques des exopolysaccharides.

Les exopolysaccharides sont exclusivement composés d'hexoses (avec, en fonction des opérations, des doses variables mais toujours très faibles de protéines <1% des exopolysaccharides, provenant probable-ment de la lyse cellulaire). L'analyse de la composition centésimales du polysaccharide et des liaisons existant entre les différentes unités a été effectuée à l'aide des techniques suivantes :

a) Composition des monosaccharides.

La teneur en hexose a été mesurée sur des échantillons non hydrolysés en utilisant des méthodes au phénol et à l'anthrone. (JP Latgé et al, Can. J. Microbiol, 30, 1507, 1984). La composition en monosaccharide a été déterminée après méthanolyse (HCl 0,5M/méthanol pendant 24 heures à 80°C). Les méthylglycosides ont été identifiés sous forme de dérivés trifluoroacétylés par chromatographie en phase gazeuse et liquide selon la méthode décrite par Zanetta et al (J. Chromatog. 69, 291, 1972).

b) Méthylation.

L'acétolyse et l'oxydation périodique des échantillons d'exopolysaccharide ont été réalisées comme décrit par Dubourdieu et al. (Carbohydr. Res. 93, 294, 1981).

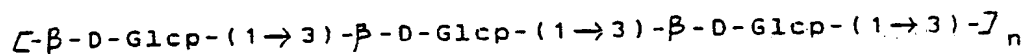
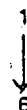
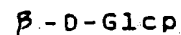
Des échantillons d'exopolysaccharides intacts ou ayant subi une acétolyse ou une oxydation périodique ont été méthylés par la méthode décrite par Finne (Carbohydr. Res. 80, 336, 1980) puis méthanolysés avec un mélange méthanol/HCl 0,5M à 80°C pendant 24 heures.

Les dérivés méthylés sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse comme décrit par Fournet et al (Anal. Biochem. 116, 486, 1981) : colonne OV 101 30 m x 0,30 mm, 110 à 230°C 2° par minute: mode d'ionisation électronique avec un potentiel d'ionisation de 70 eV.

c) Analyse enzymatique.

Le glucane peut être dégradé par un extrait de Trichoderma (Novozym 1161). La digestion enzymatique du glucane nécessite la présence simultanée d'exo et d'endo (1→3) glucanase. L'adjonction de (1→6) glucanase, accélère la dégradation (compositions enzymatiques préparées selon le protocole décrit par Dubourdieu, Thèse Université de Bordeaux, 1982).

Les exopolysaccharides comprennent des chaînes de type bêta (1→3)(1→6) glucane de formule :



Il existe aussi des liaisons interchaînes ainsi que le prouve l'identification de 4,6-diméthylglucopyranoside et de 4- et 6-monométhylglucopyranosides dans les produits de méthylation après méthanolyse.

La présence de mannanes a aussi été détectée dans certaines préparations d'exopolysaccharides. Les chaînes principales contiennent des mannoses liés en 1→2, 1→3 et 1→6. Les branchements entre chaînes sont au niveau des carbones 2 et 6 de résidus mannose. Le pourcentage de mannane varie suivant les souches et

les opérations entre 0 et 75 % des exopolysaccharides.

La masse moléculaire des exopolysaccharides est $> 2 \cdot 10^6$. Ainsi sur Superose 6, les exopolysaccharides sont élués à l'exclusion au même endroit que le dextrane de référence T2000 (ayant une masse moléculaire voisine de 2×10^6).

En microscopie électronique à transmission (ombrage C-Pt à 5-7° après incubation des sucres en présence d'acétate d'uranyle), les exopolysaccharides dans leur milieu de culture apparaissent comme un faisceau de plusieurs fibrilles (largeur totale comprise entre 2 et 4 nm, longueur impossible à mesurer) résultant de l'accouplement de fibrilles. Cet arrangement fibrillaire explose après ultrasonication des exopolysaccharides.

Solubilité des exopolysaccharides :

A saturation, après filtration stérilisante sur filtre 0,45 μ m, la solubilité est de 600-700 ug/ml d'eau ou d'eau physiologique (NaCl 0,9%).

4. Activité biologique.

Les exopolysaccharides ont des propriétés antitumorales dues à une stimulation globale du système immunitaire.

a) Activité antitumorale.

Les exopolysaccharides à activité antitumorale ont été inoculés chaque jour à des souris avant inoculation de la tumeur à partir de J-11 jusqu'à J-1 ou après inoculation de la tumeur de J+1 à J+11.

- Sarcome 180/CD1

A J+30, pour des doses de 0,2 à 5 mg/kg d'exopolysaccharides de Nomuraea rileyi, la tumeur est totalement inhibée. Dans les animaux témoins, la tumeur pèse 4,2 g. L'inhibition totale de la tumeur nécessite des doses de schizophyllane de 1 à 5 mg/kg. A

0,2 mg/kg de schizophyllane, l'inhibition de la tumeur est voisine de 60 à 70%.

- Fibrosarcome DBA₂/McSc1

5 A J+38, le poids de la tumeur des animaux témoins est 4,2 g, celui de ceux traités par le schizophyllane 5 mg/kg est de 2,9 g (toutes les souris ayant la tumeur). En revanche cinq animaux sur 10 traités avec 5 mg/kg de l'exopolysaccharides de Nomuraea rileyi ne présentent plus de tumeur (poids moyen de la tumeur sur tous les animaux traités : 0,9 g).

b) Activité anti-microbienne

15 Les exopolysaccharides de Nomuraea rileyi ont été inoculés à des souris Swiss à la dose de 1 mg/kg à J-7, J-3 et J-1 avant inoculation de Aspergillus fumigatus et Candida albicans.

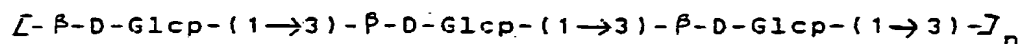
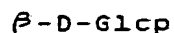
A J+15, 9 souris/10 du lot témoin sont tuées par Aspergillus fumigatus alors que 3/10 seulement sont mortes dans le lot où les souris ont reçu l'exopolysaccharide de Nomuraea rileyi.

20 A J+15, 8 souris/10 sont tuées par Candida dans le lot témoin alors que 1 souris/10 seulement est morte dans le lot ayant reçu les 3 injections de l'exopolysaccharide de Nomuraea rileyi.

REVENDICATIONS

1. Exopolysaccharides fongiques ayant une activité immunostimulante, comprenant des chaînes de type glucane de formule

5



10

qui présentent entre elles des pontages, et éventuellement des chaînes de type mannane et ayant une masse moléculaire au moins égale à $5 \cdot 10^5$.

15

2. Exopolysaccharides selon la revendication 1, qui sont produits par Nomuraea rileyi.

20

3. Procédé d'obtention d'un exopolysaccharide selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver une souche productrice de l'exopolysaccharide, à séparer par filtration le milieu de culture et à séparer par précipitation ou ultrafiltration les exopolysaccharides du milieu de culture.

25

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on effectue une culture de Nomuraea rileyi dans un milieu de culture comprenant de 3 à 6% en poids de glucose et 1 à 2% en portion d'extrait de levure.

30

5. Procédé selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce qu'on sépare les exopolysaccharides du milieu de culture par précipitation par l'éthanol.

35

6. Composition thérapeutique comprenant à titre de principe actif un exopolysaccharide selon la revendication 1 ou la revendication 2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 89/00262

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to international Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁴ C 12 P 19/04, C 08 B 37/00, A 61 K 31/715		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System :	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁴	C 08 B, C 12 P, A 61 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages **	Relevant to Claim No. **
X	FR, A, 2406447 (M. SUGIURA) 18 May 1979 see claims	1,3,6
X	Patent Abstracts of Japan, vol. 7, No. 252 (C-194) (1397), 9 November 1983, page 73, & JP, A, 58138392 (NIPPON GOSEI GOMU K.K.) 17 August 1983 see abstract	1,3,6
A	Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol. 28, No. 9, 1980, (Tokyo, JP), S. Ukai et al.: "Polysaccharides in fungi. V. Isolation and characterization of a mannan from aqueous ethanol extract of Dictyophora indusiata fisch", pages 2647-2652 see abstract	1
P,X	Carbohydrate Research, vol. 181, October 1988, Elsevier Science Publishers B.V., (Amsterdam, NL), J.-P. Latgé et al.: "Structure of the exocellular polysaccharide produced by the fungus, Nomuraea rileyi", pages 282-286 see the whole document	1-6

<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: **</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
25 August 1989 (25.08.89)	18 September 1989 (18.09.89)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

FR 8900262
SA 29283

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A- 2406447	18-05-79	JP-A- 54061112	17-05-79
		CA-A- 1107725	25-08-81
		DE-A- 2845765	26-04-79
		GB-A, B 2007246	16-05-79
		US-A- 4225673	30-09-80
		US-A- 4237266	02-12-80

Rest Available Copy

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 89/00262

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁴ : C 12 P 19/04, C 08 B 37/00, A 61 K 31/715		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴	C 08 B, C 12 P, A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X	FR, A, 2406447 (M. SUGIURA) 18 mai 1979 voir revendications --	1, 3, 6
X	Patent Abstracts of Japan, vol. 7, no. 252 (C-194)(1397), 9 novembre 1983, page 73, & JP, A, 58138392 (NIPPON GOSEI GOMU K.K.) 17 août 1983 voir résumé --	1, 3, 6
A	Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol. 28, no. 9, 1980, (Tokyo, JP), S. Ukai et al.: "Polysaccharides in fungi. V. Isolation and characterization of a mannan from aqueous ethanol extract of Dictyophora indusiata fisch", pages 2647-2652 voir résumé -- ./.	1
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 25 août 1989		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 18 SEP 1989
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		Signature du fonctionnaire autorisé T.K. WILLIS

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (Janvier 1985)

Best Available Copy

Demande internationale N° PCT/FR 89/00262

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
P,X	Carbohydrate Research, vol. 181, octobre 1988, Elsevier Science Publishers B.V., (Amsterdam, NL), J.-P. Latgé et al.: "Structure of the exocellular polysaccharide produced by the fungus, Nomuraea rileyi", pages 282-286 voir l'article en entier -----	1-6

Formulaire PCT/ISA.210 (feuille additionnelle) (Janvier 1985)

Best Available Copy

FR 8900262
SA 29283

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 08/09/89
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A- 2406447	18-05-79	JP-A- 54061112	17-05-79
		CA-A- 1107725	25-08-81
		DE-A- 2845765	26-04-79
		GB-A, B 2007246	16-05-79
		US-A- 4225673	30-09-80
		US-A- 4237266	02-12-80
<hr/>			

Rest Available Copy